用 RAPD 标记研究蚱属五个种间的亲缘关系

蒋国芳[1]，陆 敢[1]，黄 琨[2]，黄日波[2]
（1. 广西科学院生物研究所，南宁 530003；2. 广西大学生物技术实验中心，南宁 530001）

摘要：用 RAPD 技术对蚱属 5 种蚱基因组 DNA 的多态性进行研究。在事先优化的反应条件下用 12 个随机引物扩增，共得到 84 条清晰稳定的多态性片段，片段长度为 200～2 000 bp。统计这些片段，根据扩增片段的共享度计算出相对遗传距离指数，然后用 UPGMA 和 NJ 聚类方法对其进行分析，构建系统树，确定了它们相互间的亲缘关系。

关键词：RAPD；蚱属；亲缘关系
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）04-0499-04

Studies on genetic variations and phylogenetic relationships among five species of *Tetrix* using RAPD markers

JIANG Guo-Fang[1]，LU Gan[1]，HUANG Kun[2]，HUANG Ri-Bo[2]（1. Institute of Biology，Guangxi Academy of Sciences，Nanning 530003，China；2. Biotechnology Center，Guangxi University，Nanning 530001，China）

Abstract: Random amplified polymorphic DNA（RAPD）techniques were applied to assess genetic variations among five species in the genus *Tetrix*. Amplifications with 12 primers under predetermined optimal reaction conditions gave 84 reproducible fragments ranging from 200 to 2 000 bp. The amplified products were scored as present（1）or absent（0）for each DNA sample and an index of genetic similarity（F）was calculated. The value of D was used to evaluate genetic distances between species and a phylogenetic tree was constructed.

Key words: RAPD；*Tetrix*；phylogenetic relationship

现代遗传学观点认为物种的遗传性状是由基因决定的，外部形态的变异及体内蛋白质分子的变化最本质的原因是由于基因中 DNA 分子碱基序列发生了改变。因此从 DNA 水平着手，生物物种的分类和系统演化及与此有关的一系列问题可望得到解决。目前随机扩增多态性（RAPD）技术已在许多生物的研究中得到了广泛的应用，取得了许多可喜进展，但在蚱属昆虫的分子分类学上迄今未见有报道。文献表明，在直翅目昆虫中应用 RAPD 技术进行分子系统学的研究已获得一些成果（Chapco *et al*.，1992；Chu *et al*.，1995；谭竹钧等，1998；张民照等，2001）。本实验运用 RAPD 技术对蚱属 5 种昆虫进行了基因组 DNA 多态性研究，从分子水平探讨它们的分类地位和亲缘关系，为蚱属的分类以及蚱科分类系统的完善提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

供试的蚱属 5 个种的个体样品采自广西 4 个县区，见表 1。

表 1 用于实验的样品

Table 1 Samples used in the experiments

样品 Samples	采集时间 Collecting date	采集地 Localities	个体数 Numbers of samples
北部湾蚱 *Tetrix beibuwanensis*	1998.10	广西龙州	6
细角蚱 *Tetrix tenuicornis*	1998.10	广西龙州	4
波氏蚱 *Tetrix bolivari*	1999.05	广西金秀	7
日本蚱 *Tetrix japonica*	1994.04	广西龙胜	6
广西蚱 *Tetrix guangxiensis*	1999.05	广西防城港	4

基金项目：广西青年科学基金资助项目（桂科青 0007014）
第一作者简介：蒋国芳，男，1965 年生，博士，研究员，主要从事昆虫分子系统学研究，E-mail：cnjgf1208@yahoo.com.cn
收稿日期 Received：2001-06-18；接受日期 Accepted：2001-11-06

1.2　仪器和试剂

PCR 仪为德国 BIOMETRA 公司的 UNO Ⅱ型 PCR 扩增仪；离心机为德国 HETTICH 公司的 MIKRO R4-4B 高速离心机；微量加样器为日本 NICHIRYO 公司的产品；照相系统为 POLAROID 公司产品；电泳仪为北京六一仪器厂 DYY-Ⅲ 31A 型电泳仪。

蛋白酶 K 为美国 MERCK 公司产品；RNaseA 为美国 Calbiochem 公司产品；Taq DNA 聚合酶、PCR 10×buffer、25 mmoL/L $MgCl_2$ 及 DNA/*Eco*RⅠ+*Hin*dⅢ分子标记物为上海生工生物工程有限公司产品；dNTP、DL2000 分子标记物为宝生物工程有限公司（大连）产品；其它药品与试剂为国产 AR 级或进口分装 AR 级产品。

1.3　实验方法

1.3.1　基因组 DNA 提取：采用本实验室改进的基因组 DNA 提取方法。每种以个体为单位抽提，取无水乙醇浸泡保存的蚱个体，去腹后于 1.5 mL EP 管中剪碎，加入适量 TE（10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，pH 8.0）缓冲液，37℃水浴 2 h，然后 4 000 r/min 离心 5 min，去掉上清，再加入适量抽提缓冲液［STE（0.1 mol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，pH 8.0），1.0% SDS，蛋白酶 K 和 RNaseA］，37℃温育过夜。再分别用等体积酚，酚:氯仿:异戊醇（25:24:1），氯仿:异戊醇（24:1）抽提，8 000 r/min 离心 5 min 分层，用等体积异丙醇沉淀 30 min，12 000 r/min 离心 10 min，70% 乙醇洗涤，干燥后用适量 TE（10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，pH 8.0）缓冲液溶解，4℃保存备用。

1.3.2　PCR 反应及产物检测、记录：用于 PCR 反应的 10 bp 随机引物，购自上海生工生物工程有限公司，共 38 个。

PCR 反应体积为 25 μL，包括 20～50 ng 的模板 DNA，0.5U Taq DNA 聚合酶，2.5 μL PCR 10×buffer，dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 0.1 mmol/L，2.0 mmol/L $MgCl_2$，0.2 μmol/L 随机引物，反应混合物用 20 μL 灭菌石蜡油覆盖。每次反应 94℃预变性 180 s 后进行 45 个循环，每个循环包括 94℃变性 1 min，32℃复性 1 min，72℃延伸 90 s，最后一个循环后 72℃再延伸 300 s，并且每次 PCR 反应均设不含 DNA 模板的空白对照。产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳，所用电泳缓冲液为 1×TAE（pH 8.0），然后经溴化乙锭染色于紫外透射仪上观察、拍照，记录电泳图谱。

1.3.3　数据处理：在每种蚱中选择有扩增带的 4 个个体，进行数据统计，记录下电泳后清晰的扩增带，同时根据 Nei 等（1979）的公式：$F = 2N_{XY}/(N_X + N_Y)$，计算出 5 种蚱随机扩增多态性 DNA 片段的共享度（也称遗传相似指数）F 和两个体之间的遗传距离指数 D，将数据结果输入计算机，用 Mega2.0 程序对其进行处理。其中 N_{XY} 是 X，Y 两个个体共有的扩增带，N_X，N_Y 是 X 和 Y 个体分别拥有的扩增带。根据遗传距离指数再进行聚类分析。

2　结果与分析

2.1　RAPD 图谱

用上海生工公司合成的 38 个随机引物对蚱属 5 个种基因组 DNA 进行 PCR 扩增，其中 12 个引物产生了较清晰的扩增带而且重复性好。每一引物产生的扩增带在 5 条左右，片段大小为 200～2 000 bp。图 1 为用引物 S1 和 S30 经 PCR 扩增后的电泳结果。12 种引物共扩增得到 83 条较为清晰的扩增带。

2.2　扩增片段共享度、遗传距离指数与数据分析

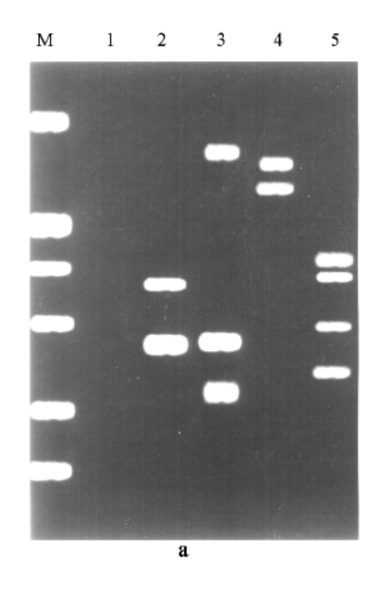
根据 Nei 等（1979）的公式，我们计算了 5 种蚱之间随机扩增多态性 DNA 片段的共享度和遗传距离指数（表 2）。将计算获得的遗传距离指数（D）输入计算机，用 NJ 和 UPGMA 法构建分子系统树，得图 2、图 3 的结果。

表 2　蚱属 5 个种的 RAPD 片段共享度（上三角）和遗传距离指数（下三角）

Table 2　The proportion of RAPD fragments shared（*F*）and the genetic distance（*D*）among five species of *Tetrx*

种名 Species	1	2	3	4	5
北部湾蚱 *T. beibuwanensis*		0.2857	0.0800	0.0000	0.1429
细角蚱 *T. tenuicornis*	0.7143		0.0588	0.1714	0.1081
波氏蚱 *T. bolivari*	0.9200	0.9412		0.0513	0.1463
日本蚱 *T. japonica*	1.0000	0.8286	0.9487		0.1429
广西蚱 *T. guangxiensis*	0.8571	0.8919	0.8537	0.8571	

注 Notes：上对角为 *F* 值，下对角为 *D* 值 *F* values in upper right corner，and *D* values in lower left corner



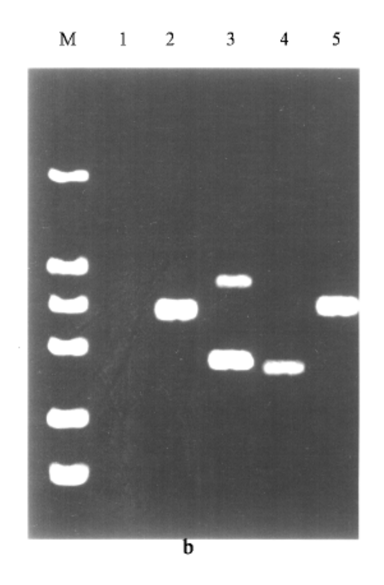


图 1　5 种蚱基因组 DNA 用随机引物 S1（a），S30（b）扩增产物电泳图

Fig. 1　The electrophoretic patterns of RAPDs from five species in *Tetrix* amplified with primers S1（a），S30（b）（M：DL2000）

a：1. 广西蚱 *T. guangxiensis*；2. 细角蚱 *T. tenuicornis*；3. 北部湾蚱 *T. beibuwanensis*；4. 波氏蚱 *T. bolivari*；5. 日本蚱 *T. japonica*

b：1. 日本蚱 *T. japonica*；2. 波氏蚱 *T. bolivari*；3. 北部湾蚱 *T. beibuwanensis*；4. 细角蚱 *T. tenuicornis*；5. 广西蚱 *T. guangxiensis*

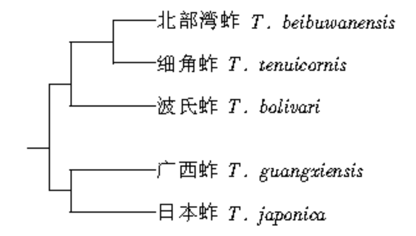


图 2　根据遗传距离用 NJ 法得到的系统树

Fig. 2　Phylogenetic tree based on the genetic distance matrices with the method of NJ

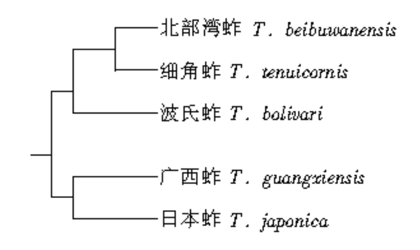


图 3　根据遗传距离用 UPGMA 法得到的系统树

Fig. 3　Phylogenetic tree based on the genetic distance matrices with the method of UPGMA

3　讨论

蚱属是蚱科昆虫中的一个大属。目前已知在蚱属中有 84 种（Yin *et al.*，1996）。本属在我国已知 36 种（蒋国芳等，1998）。长期以来人们就蚱属中各种蚱的分类地位进行了不断的研究。但由于传统的分类手段只是依靠表型特征，对于表型特征比较接近的种类，在确定其分类地位时往往存在一定的困难，所以到目前为止，关于蚱属中 84 种蚱的分类尚未达成一致的认识。梁铬球等（1998）、蒋国芳等（1998）均通过对我国蚱属的观察并根据中足股节、前胸背板将它分为两组。当今以形态特征为表型来进行这方面的工作存在很大的困难，所以迄今尚无人就蚱属的进一步系统分类工作提出令人满意的意见。

我们选取在广西分布的 5 种蚱用 RAPD 技术进行研究，以探讨该技术在蚱的种属分类、亲缘关系分析、物种起源鉴定等诸多领域研究中的可行性。从图 2～3 所示的结果来看，北部湾蚱和细角蚱二者的关系最近，他们首先聚类在一起，然后与波氏蚱聚在一起，最后是广西蚱和日本蚱。用两种聚类分析方法所得到的结果基本是一致的，说明了该结果基本上是真实可靠的。从图 2～3 上还可以发现，日本蚱与其它 4 种蚱的关系较远（相对遗传距离为 0.8286～1.0000）。同时，日本蚱是这 5 种蚱中分布最为广泛的一种蚱。据此推测，日本蚱可能是一个较为古老的物种，其余的 4 个种均从它分化而来；

从各个种的分化进程来推测，北部湾蚱和细角蚱分化得最晚。通过对蚱属中 5 种蚱基因组 DNA RAPD 的初步研究，我们分析蚱属一些种之间的亲缘关系相差较大，如何确定各自的分类地位，对一些特殊的种类是划分为亚属或是提升为属有必要作进一步深入的调查和研究，而 RAPD 技术在该研究中无疑是一种较为快速而有效的分析手段。

参 考 文 献 （References）

Chapco W，Ashton N W，Martel R K B，Antonishyn N，Crosby W L，1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome*，35（4）：569－574.

Chu J，Powers E，Howard D J，1995. Gene exchange in a ground cricket hybrid zone. *J. Hered.*，86（1）：17－21.

Jiang G F，Zheng Z M，1998. Grasshoppers and Locusts from Guangxi. Guilin：Guangxi Normal University Press.［蒋国芳，郑哲民，1998. 广西蝗虫. 桂林：广西师范大学出版社］

Liu B，1999. Studies of RAPD repeatability of genomic DNA in grasshoppers and ladybugs. *Wuyi Sciences*，15：114－117.［刘波，1999. 蝗虫，瓢虫基因 DNA RAPD 技术重复性的研究. 武夷科学，15：114－117］

Liang G Q，Zheng Z M，1998. Fauna Sinica，Insecta. Vol. 12，Orthoptera，Tetrgoidea. Beijing：Science Press.［梁铬球，郑哲民，1998. 中国动物志，昆虫纲 第 12 卷，直翅目，蚱总科. 北京：科学出版社］

Tan Z J，Han Y L，Su H F，Zheng Z M，1998. Comparative studies of genomic DNA of six grasshoppers in genus *Chorthippus* using RAPD markers. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nei Mongol*，29（6）：801－805.［谭竹钧，韩雅莉，苏和风，郑哲民，1998. 雏蝗属（*Chorthippus*）六种蝗虫基因组 DNA 的 RAPD 比较研究. 内蒙古大学学报（自然科学版），29（6）：801－805］

Wang G L，Zheng Z M，2000. Comparative study of RAPD patterns variations in 5 families of Acridoidea. *Journal of Shaanxi Normal University*（*Natural Science Edition*），28（1）：83－85.［汪桂玲，郑哲民，2000. 蝗总科 5 科蝗虫间 RAPD 带型变异的比较研究. 陕西师范大学学报（自然科学版），28（1）：83－85］

Yin X C，Shi J P，Yin Z，1996. A Synonymic Catalogue of Grasshoppers and Their Allies of the World，Orthoptera：Caelifera. Beijing：China Forestry Publishing House. 914－922.［印象初，施鉴屏，印展，1996. 世界蝗虫及其近缘种类分布目录. 北京：中国林业出版社. 914－922］

Zhang M Z，Kang L，2001. Extraction of total DNA from locusts and optimization of reaction conditions for RAPD analysis. *Zoological Research*，22（1）：20－26.［张民照，康乐，2001. 飞蝗中 DNA 的抽提及其 RAPD 分析条件的摸索. 动物学研究，22（1）：20－26］